



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201720426 A

(43) 公開日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 16 日

(21) 申請案號：105139148

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 28 日

(51) Int. Cl. : *A61K9/14 (2006.01)* *A61K39/00 (2006.01)**A61K47/18 (2006.01)* *A61K47/36 (2006.01)*

(30) 優先權：2015/11/27 日本 特願 2015-232448

(71) 申請人：日東電工股份有限公司 (日本) NITTO DENKO CORPORATION (JP)  
日本

(72) 發明人：清遠英司 KIYOTOH, EIJI (JP)；堀光彥 HORI, MITSUHIKO (JP)；淺利大介 ASARI, DAISUKE (JP)；大久保勝之 OKUBO, KATSUYUKI (JP)；宍戶卓矢 SHISHIDO, TAKUYA (JP)；深坂昌弘 FUKASAKA, MASAHIRO (JP)；松下恭平 MATSUSHITA, KYOHEI (JP)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：0 共 24 頁

(54) 名稱

流感疫苗乾燥製劑、及流感疫苗乾燥製劑之製造方法

(57) 摘要

本發明提供一種即便不在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存亦能夠穩定地維持流感疫苗之活性，且可穩定地供給之流感疫苗乾燥製劑。又，本發明提供該流感疫苗乾燥製劑之製造方法。本發明係一種流感疫苗乾燥製劑，其特徵在於含有流感疫苗抗原、二糖、及胺基酸。



## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

流感疫苗乾燥製劑、及流感疫苗乾燥製劑之製造方法

### 【中文】

本發明提供一種即便不在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存亦能夠穩定地維持流感疫苗之活性，且可穩定地供給之流感疫苗乾燥製劑。又，本發明提供該流感疫苗乾燥製劑之製造方法。

本發明係一種流感疫苗乾燥製劑，其特徵在於含有流感疫苗抗原、二糖、及胺基酸。

### 【指定代表圖】

無

### 【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

流感疫苗乾燥製劑、及流感疫苗乾燥製劑之製造方法

### 【技術領域】

本發明係關於一種含有流感疫苗之乾燥製劑。更詳細而言，本發明係關於一種即便不在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存亦能夠穩定地維持流感疫苗之活性，且可穩定地供給之流感疫苗乾燥製劑。又，本發明係關於該流感疫苗乾燥製劑之製造方法。

### 【先前技術】

流感係一種因流感病毒引起之急性感染病。感染流感病毒至流感發病之潛伏期通常為1~2天。於發病之情形時，會出現38度以上之發熱，除了全身倦怠感、頭痛、關節痛、肌肉痛等全身症狀以外，亦會出現咽喉疼痛、咳嗽、流鼻涕等症狀。一般而言，會於1週以內康復。關於流感，於老年人、嬰兒、孕婦、呼吸系統或循環系統患有慢性疾病之患者、糖尿病患者、慢性腎功能衰竭患者等發病之情形時，存在引起肺炎或支氣管炎等併發症之情況，亦存在嚴重化而導致死亡之情況。又，流感由於會在短時間內集中流行，故而存在產生社會性影響，引起經濟損失之情況。

為了防止流感之嚴重化，投與流感疫苗係最有效之方法。流感疫苗製劑一般為以注射劑或滴鼻劑之形式使用之液劑。

然而，於流通流感疫苗液劑之情形時，為了防止流感疫苗失活，需要於流通及保存之所有步驟中進行溫度管理(所謂冷鏈)。流感根據地區不同而時期不同，於全世界流行，於難以溫度管理之國家或地區，難以於維持流感病毒抗原之活性之情況下流通。

又，目前能夠利用之流感疫苗大致分為減毒化活流感疫苗及不活化流感疫苗。進而，不活化流感疫苗分為(1)利用福馬林等進行不活化之全粒子病毒、(2)使用有機溶劑或界面活性劑將病毒粒子進行粉碎，使脂質外膜(envelope)溶解而獲得之裂解疫苗、(3)將血球凝集素(HA)及神經胺糖酸苷酶(NA)進行精製而獲得之次單元疫苗之3種。該等之中，現市售之流感疫苗為裂解疫苗及次單元疫苗之2種。任一疫苗均通常使用有機溶劑或界面活性劑將病毒粒子進行粉碎，並根據種類將病毒蛋白質分離或精製而製備。

然而，流感病毒粒子之固醇含量較高，通常穩定，於將病毒粒子進行粉碎，並去除病毒粒子之脂質物質，而將病毒蛋白質進行分離或精製之情形時，會產生如下問題：於保存期間，效價隨時間經過而降低等。如此，裂解疫苗及次單元疫苗未必穩定，因此為了維持流感疫苗抗原之活性，需要於流通及保存之所有步驟中進行溫度管理。

作為用以克服此種流感疫苗液劑之缺點之方法，正嘗試製成乾燥製劑之形態。

例如專利文獻1中揭示有：將流感病毒與增黏劑一併進行噴霧乾燥，而製造粒子。例如專利文獻2中揭示有：將抗原與各種添加劑一併進行噴霧乾燥，而製造粉體。例如專利文獻3中提出有一種醫藥組合物，其藉由將包含作為穩定劑之蔗糖、作為結合劑之葡聚糖、作為賦形劑之三仙膠之溶液進行冷凍乾燥，而使作為流感活疫苗之減毒化流感病毒穩定化。例如專利文獻4中提出有一種醫藥組合物，其藉由將包含作為穩定劑之疏水性胺基酸(苯丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸)及精胺酸鹽酸鹽之溶液進行冷凍乾燥，而使流感HA疫苗穩定化。

季節性流感HA疫苗為每年變更流行型之疫苗，主流為3價(A型2種及B型1種)或者4價(A型2種及B型2種)之混合型。然而，由於胺基酸排列或立體結構因病毒型而不同，故而先前之疫苗製劑化技術難以將複數種流感HA疫苗以1種醫藥組合物之形式穩定地儲藏。

先前技術文獻

專利文獻

專利文獻1：國際公開第2004/058156號

專利文獻2：國際公開第2002/101412號

專利文獻3：國際公開第2002/013858號

專利文獻4：日本專利第5388842號公報

#### 【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

鑒於上述情況，本發明之目的在於提供一種即便不在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存亦能夠穩定地維持流感疫苗之活性，且可穩定地供給之流感疫苗乾燥製劑。

又，本發明之目的在於提供一種製造流感疫苗乾燥製劑之方法，該方法即便於流感疫苗乾燥製劑之製造步驟中，其中所含之流感疫苗抗原亦不會產生活性降低。

[解決問題之技術手段]

本發明者等人為了解決上述問題，進行了努力研究，結果發現：藉由含有各種添加劑中尤其是二糖、及胺基酸，即便不如先前之液劑般在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存，亦能夠穩定地維持流感疫苗之活性。

又，關於此種流感疫苗乾燥製劑，由於流感疫苗藉由可廉價地供給之二糖及胺基酸而得到穩定化，故此種流感疫苗乾燥製劑亦係能夠穩定地供給者。

即，本發明係一種流感疫苗乾燥製劑，其特徵在於含有流感疫苗抗原、二糖及胺基酸。

上述二糖較佳為選自由海藻糖、異麥芽糖、蔗糖、麥芽糖、蜜二糖、巴拉金糖及乳酮糖所組成之群中之至少1種以上。

上述胺基酸較佳為選自由精胺酸、離胺酸、脯胺酸、蘇胺酸、鳥胺酸、丙胺酸、半胱胺酸、苯丙胺酸、甘胺酸、羥基脯胺酸、及該等之鹽所組成之群中之1種以上。

上述流感病毒抗原較佳為不活化抗原，上述不活化抗原較佳為裂解疫苗抗原或次單元疫苗抗原，其中，上述不活化抗原較佳為裂解疫苗抗原。

又，本發明亦係一種流感疫苗乾燥製劑之製造方法，其係將含有流感疫苗抗原、二糖、及胺基酸之含流感疫苗抗原之水溶液進行乾燥者，並且上述胺基酸為選自由精胺酸、離胺酸、脯胺酸、蘇胺酸、鳥胺酸、丙胺酸、半胱胺酸、苯丙胺酸、甘胺酸、羥基脯胺酸、及該等之鹽所組成之群中之1種以上。

以下，對本發明進行詳細說明。

本發明之流感疫苗乾燥製劑含有流感疫苗抗原。

此處所述之所謂「乾燥製劑」，意指含水率為15質量%以下之製劑。將上述乾燥製劑之中含水率為10質量%以下者特別稱為低含水率乾燥製劑。

再者，此處所述之所謂「含水率」係根據日本藥典第十六修訂版、一般試驗法、乾燥減量法(以下，亦簡稱為乾燥減量法)而求出。即，根據將本發明之流感疫苗乾燥製劑之試片以105°C、3小時之條件進行加熱時之質量之減少比率而求出。

本發明之流感疫苗乾燥製劑較佳為固形製劑。此處所述之所謂固形製劑，意指於室溫(25°C)下為固體之藥品製備物，即不具有流動性之藥品製備物。

上述流感疫苗抗原所使用之流感病毒並無特別限定，例如可列舉A型流感疫苗抗原、B型流感疫苗抗原等。上述流感疫苗抗原所使用之流感病毒可為僅1種，較佳為包含A型1種以上及B型1種以上之2種以上之流感疫苗抗原。其中，A型流感疫苗抗原中，較佳為H1N1型及H3N2型，B型流感疫苗抗原中，除山形系統及維多利亞系統之以外，較佳為布里斯班系統。

作為上述流感疫苗，並無特別限定，可使用活病毒或不活化抗原。其中，上述流感病毒抗原較佳為不活化抗原，作為上述不活化抗原，可使用不活化全粒子病毒、裂解疫苗抗原或次單元疫苗抗原，較佳為裂解疫苗抗原或次單元疫苗抗原，更佳為裂解疫苗抗原。

作為上述不活化抗原，例如較佳為於發育雞蛋中使病毒粒子增殖後，使用有機溶劑或界面活性劑將病毒粒子進行粉碎並根據種類將病毒蛋白質進行分離或精製而製備之裂解疫苗抗原或次單元疫苗抗原，更佳為裂解疫苗抗原。

上述裂解疫苗抗原之種類並無特別限定，例如可列舉：血球凝集素(HA)抗原、神經胺糖酸苷酶(NA)抗原、基質(M1)抗原、基質(M2)抗原、

核蛋白質(NP)抗原等。其中，就藉由流感疫苗乾燥製劑之投與而獲得對於預防感染有效之免疫之觀點而言，較佳為作為病毒表面抗原之血球凝集素(HA)抗原。

上述流感疫苗抗原可含有2種以上之疫苗抗原，亦可含有單一之疫苗抗原。

製造上述流感疫苗抗原之方法並無特別限定，可使用先前公知之方法。例如，可使自流感患者或流感感染動物單離之病毒類型藉由常規方法感染雞蛋或細胞等並進行培養、精製，由所獲得之病毒原液製造流感疫苗抗原。又，亦可將藉由基因工程方法於各種細胞中產生重組病毒或特定之抗原而成者作為材料而製造流感疫苗抗原。

於本發明之流感疫苗乾燥製劑中，上述流感疫苗抗原含有有效量即可，例如於本發明之流感疫苗乾燥製劑中，以抗原之合計含量計，每1次投與量較佳為0.01  $\mu\text{g}$ ~1.0 mg之範圍。若未達0.01  $\mu\text{g}$ ，則存在作為感染病之預防或治療劑之功能變得不充分之情況，若超過1.0 mg，則存在安全性方面成為問題之情況。上述抗原含量之更佳下限為0.1  $\mu\text{g}$ ，更佳上限為500  $\mu\text{g}$ 。

本說明書中所述之所謂「抗原之質量」，除特別記載之情形以外，係指疫苗組合物中之抗原所含之全部抗原蛋白質之合計質量。因此，於抗原為病毒等源自生物體之物質之情形時，意指該抗原所含之全部蛋白質之質量。又，於包含複數種抗原之情形時，意指其合計質量。

本發明之流感疫苗乾燥製劑含有二糖及胺基酸。

本發明之流感疫苗乾燥製劑由於含有該等成分，故而即便不在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存，亦能夠以較高之活性穩定地維持流感

疫苗抗原之活性。

上述二糖較佳為選自由海藻糖、異麥芽糖、蔗糖、麥芽糖、蜜二糖、巴拉金糖及乳酮糖所組成之群中之至少1種以上。該等二糖係使上述流感疫苗抗原穩定化者，含有於本發明之流感疫苗乾燥製劑中。

上述二糖更佳為選自由海藻糖、異麥芽糖及蔗糖所組成之群中之1種以上。

進而，二糖進而較佳為海藻糖及/或異麥芽糖。海藻糖及異麥芽糖尤其是穩定化效果較高，又，於與胺基酸一併製作乾燥製劑之情形時，有作為副反應之梅納反應(Maillard reaction)，就能夠防止該反應之方面而言，亦較佳為作為非還原糖之海藻糖、異麥芽糖。

關於上述二糖之含量，基於流感疫苗乾燥製劑之總質量，較佳為5~70質量%，更佳為20~70質量%。

若上述二糖之含量未達5質量%，則存在無法獲得充分之疫苗穩定性之可能性。

上述胺基酸較佳為選自由精胺酸、離胺酸、脯胺酸、蘇胺酸、鳥胺酸、丙胺酸、半胱胺酸、苯丙胺酸、甘胺酸、羥基脯胺酸、及該等之鹽所組成之群中之1種以上。該等胺基酸係使上述流感疫苗穩定化者，含有於本發明之流感疫苗乾燥製劑中。

上述胺基酸更佳為L-型。

上述胺基酸進而較佳為選自由精胺酸鹽酸鹽、脯胺酸、蘇胺酸、及鳥胺酸鹽酸鹽所組成之群中之1種以上。其原因在於：即便不在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存，亦能夠以較高之活性穩定地維持流感疫苗抗原之活性。

進而，上述胺基酸最佳為精胺酸鹽酸鹽。由於藉由將精胺酸鹽酸鹽與二糖併用，能夠更有效地穩定地維持A型流感抗原、尤其是H3N2抗原、及B型流感抗原之活性，故而能夠穩定地維持H1N1型、H3N2型、及B型流感抗原之全部之活性。

再者，本說明書中所述之所謂鹽，可為任意之有機酸或無機酸之鹽，較佳為藥學上所容許之鹽。其中，更佳為鹽酸鹽。

關於上述胺基酸之含量，基於流感疫苗乾燥製劑之總質量，較佳為0.1~50質量%，更佳為1~40質量%，最佳為1~10質量%。若上述胺基酸之含量未達0.1質量%，則存在無法獲得充分之疫苗穩定性之可能性。

本發明之流感疫苗乾燥製劑較佳為含有免疫活化劑(佐劑)。

作為上述佐劑，例如可列舉選自由類鐸受體4(TLR4)促效劑、類鐸受體2/6(TLR2/6)促效劑、及環狀二核苷酸或其衍生物或者鹽所組成之群中之至少1種。其中，較佳為TLR4促效劑。

作為上述TLR4促效劑，可適宜地列舉脂多糖或其鹽。再者，本說明書中所述之脂多糖除脂多糖其本身以外，只要具有其性質，則亦可為其衍生物或者改形體。

又，上述脂多糖可為來自革蘭氏陰性菌細胞壁之萃取物或其改形體，亦可為合成品。

作為上述革蘭氏陰性菌，例如可列舉：醋酸桿菌屬、無色桿菌屬、嗜熱酸菌屬、嗜酸菌屬、酸球形菌屬、酸胞菌屬、酸單胞菌屬、農桿菌屬、亞細亞屬、芽孢桿菌屬、別爾納普氏菌屬、布氏桿菌屬、類桿菌屬、博德氏桿菌屬、芽胞梭菌屬、脆弱球菌屬、披衣菌屬、腸桿菌屬、大腸桿菌屬、黃桿菌屬、文氏桿菌屬、葡糖醋桿菌屬、葡萄桿菌屬、嗜血桿菌

屬、柯紮克氏菌屬、克雷伯氏菌屬、Leahibacter屬、勒克氏菌屬、退伍軍人菌屬、甲烷囊菌屬、甲烷八聯球菌屬、微球菌屬、鼠球菌屬、奈瑟氏球菌屬、新亞細亞菌屬、Oleomonas屬、泛菌屬、鄰單胞菌屬、副脆弱球菌屬、假單胞菌屬、卟啉單胞菌屬、變形桿菌屬、拉恩氏菌屬、紅球形菌屬、玫瑰球菌屬、Rubritepida屬、沙門氏菌屬、志賀桿菌屬、寡養單胞菌屬、糖桿菌屬、沙雷氏菌屬、星狀菌屬、Swaminathania屬、弧菌屬、副溶血性弧菌屬、Teichococcus屬、黃單胞菌屬、耶氏桿菌屬、醱酵單胞菌屬、紮瓦爾金氏菌屬等。作為上述革蘭氏陰性菌，較佳為可列舉：埃希氏菌屬、志賀桿菌屬、沙門氏菌屬、克雷伯氏菌屬、變形桿菌屬、耶氏桿菌屬、弧菌屬、副溶血性弧菌屬、嗜血桿菌屬、假單胞菌屬、退伍軍人菌屬、博德氏桿菌屬、布氏桿菌屬、文氏桿菌屬、類桿菌屬、奈瑟氏球菌屬、披衣菌屬、鄰單胞菌屬、卟啉單胞菌屬、泛菌屬、農桿菌屬、寡養單胞菌屬、腸桿菌屬、醋酸桿菌屬、黃單胞菌屬、醱酵單胞菌屬等。

其中，較佳為源自大腸桿菌屬、源自沙門氏菌屬、源自泛菌屬、源自醋酸桿菌屬、源自醱酵單胞菌屬、源自黃單胞菌屬或源自腸桿菌屬者。該等自古以來包含於眾多之食品、中藥中，對生物體之安全性得到保證，尤其是源自泛菌屬者現用作健康食品，認為更有效。亦可直接使用源自該等菌之萃取物或其改形體。

作為脂多糖，於使用上述來自革蘭氏陰性菌細胞壁之萃取物或經精製之脂多糖之情形時，一般需要顧及對生物體之安全性，可使用將該等進行解毒化而獲得之改形體。另一方面，醋酸桿菌屬(醋酸菌、木醋桿菌、醋酸菌等)、醱酵單胞菌屬(運動醱酵單胞菌等)、黃單胞菌屬(野油菜黃單胞菌等)、腸桿菌屬(陰溝桿菌等)、泛菌屬(成團泛菌等)自古以來包含於眾

多之食品、中藥中，對生物體之安全性得到保證，亦可直接使用源自該等菌之萃取物或經精製之脂多糖。

作為上述脂多糖之衍生物，例如可列舉將其多糖部分去除而獲得之衍生物，具體為脂質A、單磷醯脂質A、3-脫醯基化單磷醯脂質A(3D-MPL)等。

作為上述將脂多糖之多糖部分去除而獲得之脂質A，亦可使用源自上述革蘭氏陰性菌之單離物、或以成為與該等源自革蘭氏陰性菌之單離物相同結構之方式合成者。

又，作為脂質A之改形體，亦可適宜地使用經脫磷酸化之單磷醯脂質或其鹽或者衍生物。再者，關於本說明書中所述之單磷醯脂質之衍生物，只要具有單磷醯脂質之性質，均可用於本發明。尤其是已於醫療用途中作為免疫活化劑有實績之3D-MPL、或美國專利申請公開第2010/0310602號說明書中所提出之未脫醯基化之合成吡喃葡萄糖脂質就對生物體之安全性之觀點而言較佳。

又，作為上述單磷醯脂質，亦可適宜地使用具有安全性及使用先例之源自沙門氏菌者。

作為上述環狀二核苷酸，較佳為環狀二嘌呤核苷酸，只要具有其特性，則亦可為其鹽或者衍生物。作為環狀二嘌呤核苷酸，例如就安全性之方面而言，可適宜地使用環狀二鳥苷單磷酸c-di-GMP、環狀二腺苷單磷酸c-di-AMP。

關於上述佐劑之含量，例如為了對1個個體投與1次，於本發明之流感疫苗乾燥製劑中，較佳為於0.1  $\mu\text{g}$ ~100 mg之範圍而含有。若未達0.1  $\mu\text{g}$ ，則存在無法獲得充分之作為感染病之預防或治療劑之功能之情況，若

超過100 mg，則存在安全性成為問題之情況。上述免疫活化劑含量之更佳下限為0.3  $\mu\text{g}$ ，更佳上限為50 mg。

本發明之流感疫苗乾燥製劑由於即便不在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存亦能夠以較高之活性穩定地維持流感疫苗抗原之活性，故而與先前之液劑相比，能夠更容易地流通及保存。

本發明之流感疫苗乾燥製劑例如即便於0~50 $^{\circ}\text{C}$ 之保存溫度下進行保存亦能夠以較高之活性穩定地維持流感疫苗抗原之活性。上述保存溫度之更佳下限為2 $^{\circ}\text{C}$ ，更佳上限為40 $^{\circ}\text{C}$ 。

本發明亦係流感疫苗乾燥製劑之製造方法，其係將含有流感疫苗抗原、二糖及胺基酸之含流感疫苗抗原之水溶液進行乾燥者，並且上述二糖為選自由海藻糖及蔗糖所組成之群中之1種以上，胺基酸為選自由精胺酸、離胺酸、脯胺酸、蘇胺酸、鳥胺酸、丙胺酸、半胱胺酸、苯丙胺酸、甘胺酸、羥基脯胺酸、及該等之鹽所組成之群中之1種以上。本方法由於即便於流感疫苗乾燥製劑之製造步驟中，其中所含之流感疫苗抗原亦能夠於不產生活性降低之情況下發揮出活性，故而有用。

上述含流感疫苗抗原之水溶液中之上述流感疫苗抗原之合計含量較佳為0.01  $\mu\text{gHA/mL}$ 以上。若上述合計含量未達0.01  $\mu\text{gHA/mL}$ ，則存在流感疫苗乾燥製劑之有效性降低之情況。上述合計含量之更佳下限為0.1  $\mu\text{gHA/mL}$ 。

關於上述含流感疫苗抗原之水溶液中之上述流感疫苗抗原之含量，就抗原之穩定性之觀點而言，較佳為20  $\text{mgHA/mL}$ 以下。上述含量之更佳上限為10  $\text{mgHA/mL}$ 。

上述含流感疫苗抗原之水溶液中之上述二糖之含量較佳為0.1~20質

量%，更佳為0.5～15質量%。

若上述二糖之含量未達0.1質量%，則有在流感疫苗乾燥製劑中，無法充分地獲得流感疫苗抗原之穩定性之可能性。另一方面，若上述二糖之含量超過20質量%，則有含流感疫苗抗原之水溶液之黏性變得非常高而成為製造上之問題之虞。又，流感疫苗乾燥製劑之吸濕性變高，若不在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存，則存在流感抗原之活性降低之情況。

上述含流感疫苗抗原之水溶液中之上述胺基酸之含量較佳為0.01～25質量/體積%。若上述含量未達0.01質量/體積%，則存在無法充分地獲得藉由上述胺基酸而獲得之穩定化之效果之情況。若上述含量超過25質量/體積%，則流感疫苗乾燥製劑之吸濕性變高，若不在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存，則存在流感疫苗抗原之活性降低之情況。又，亦有上述胺基酸之結晶化受到促進，而使流感疫苗抗原之活性降低之虞。上述含量之更佳上限為20質量/體積%，更佳下限為0.05質量/體積%，進而較佳上限為15質量/體積%。

上述流感疫苗抗原由於對熱不穩定，故而較佳為於非加熱下進行乾燥。

上述於非加熱下進行乾燥之方法並無特別限定，較佳為減壓乾燥法或冷凍乾燥法，尤佳為冷凍乾燥法。上述冷凍乾燥法並無特別限定，可使用先前公知之使用冷凍乾燥裝置之方法。

本發明之流感疫苗乾燥製劑可藉由冷凍乾燥法使上述含流感疫苗抗原之水溶液乾燥製成錠劑或粒子狀製劑而使用，亦可將上述含流感疫苗抗原之水溶液進行減壓乾燥製成膜狀製劑而使用，還可使上述含流感疫苗抗原之水溶液乾燥之後進行混合、打錠製成錠劑而使用。

### [發明之效果]

本發明之流感疫苗乾燥製劑由於即便不在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存亦能夠以較高之活性穩定地維持流感疫苗抗原之活性，故而與先前之液劑相比，能夠更容易地流通及保存。

又，關於本發明之流感疫苗乾燥製劑，由於流感疫苗抗原藉由可廉價且穩定地供給之二糖及胺基酸而得到穩定化，故而本發明之流感疫苗乾燥製劑亦係能夠穩定地供給者。

進而，本發明之流感疫苗乾燥製劑由於亦可直接或於使用時使其溶解或分散於生理鹽水或注射水等能夠對生物體投與之溶劑中而使用，故而可應用於各種投與形態。具體而言，可作為投與至鼻黏膜、口腔內黏膜(例如，頰側、舌下、舌上、舌背)、眼黏膜、耳黏膜、生殖器黏膜、咽黏膜、氣管黏膜、支氣管黏膜、肺黏膜、胃黏膜、腸道黏膜或直腸黏膜之黏膜投與製劑、或注射劑而使用。

進而，於將本發明之流感疫苗乾燥製劑製成投與至口腔內黏膜之劑形而使用之情形時，具有如下優點：因優異之適應性、例如非侵入性投與、無痛、消除來自注射之恐懼、投與簡便，故而患者可自行投與；亦能夠避免醫療從業者之針刺感染事故之風險；能夠降低進行重複投與之情形時去醫院之頻度；能夠對患者之生活質量之提昇作出貢獻；不產生注射針之類的需特殊廢棄之醫療廢棄物。進而，本發明之流感疫苗乾燥製劑於製成投與至黏膜之劑形而使用之情形時，亦具有能夠誘導與注射投與相比更強之免疫(IgA抗體)之優點。

### 【實施方式】

以下，例示本發明之實施例，進一步具體地進行說明，但本發明並

不限定於該等。

(實施例1~40)

(冷凍乾燥流感HA疫苗製劑)

對於流感HA抗原(A型H1N1：A/加利福尼亞/7/2009；A型H3N2：A/維多利亞/361/2011；B型山形系統：B/威斯康辛/1/2010；及B型維多利亞系統：B/布里斯班/60/2008；阪大微生物病研究會製造)，如表1~4所示，添加作為二糖之海藻糖(林原製造)或蔗糖(和光純藥工業製造)、作為胺基酸之L(+)-精胺酸鹽酸鹽(和光純藥工業製造)、L-離胺酸鹽酸鹽(和光純藥工業製造)、L(-)-脯胺酸(和光純藥工業製造)、L-蘇胺酸(和光純藥工業製造)或L(+)-精胺酸(和光純藥工業製造)後，加入下述組成之製備用PBS(phosphate buffered saline，磷酸鹽緩衝液)(磷酸緩衝氯化鈉液)，以使上述二糖之含量成為10質量/體積%、使上述胺基酸之含量成為5質量/體積%、使上述流感HA抗原之含量成為100  $\mu\text{gHA/mL}$ (相對於上述流感HA抗原1質量份，上述二糖為1000質量份，上述胺基酸為500質量份)之方式製備含流感疫苗抗原之水溶液。將所獲得之含流感疫苗抗原之水溶液30  $\mu\text{L}$ 分注至1.5 mL之Safe-Lock管(eppendorf公司製造)，並將其冷凍乾燥，而獲得流感疫苗乾燥製劑。

製備用PBS

氯化鈉(和光純藥工業製造)	4.25 g
磷酸氫二鈉十二水合物(和光純藥工業製造)	1.76 g
磷酸二氫鈉二水合物(和光純藥工業製造)	0.35 g
蒸餾水	定容至500 mL

(比較例1、15、29及43)

(未添加糖及胺基酸之流感HA疫苗製劑)

如表1~4所示，不添加二糖及胺基酸，除此以外，以與實施例1等相同之方式獲得流感疫苗乾燥製劑。

(比較例2~4、16~18、30~32及44~46)

(添加糖之流感HA疫苗製劑)

如表1~4所示，添加作為糖之海藻糖(林原製造)、蔗糖(和光純藥工業製造)或葡萄糖(和光純藥工業製造)，以使上述糖之含量成為20質量/體積%、使上述流感HA抗原之含量成為100  $\mu\text{gHA/mL}$ (相對於上述流感HA抗原1質量份，上述糖為50質量份)之方式進行添加，未添加胺基酸，除此以外，以與實施例1相同之方式獲得流感疫苗乾燥製劑。

(比較例5~9、19~23、33~37及47~51)

(添加胺基酸之流感HA疫苗製劑)

如表1~4所示，添加作為胺基酸之L(+)-精胺酸鹽酸鹽(和光純藥工業製造)、L-離胺酸鹽酸鹽(和光純藥工業製造)、L(-)-脯胺酸(和光純藥工業製造)、L-蘇胺酸(和光純藥工業製造)或L(+)-精胺酸(和光純藥工業製造)，以使上述胺基酸之含量成為10質量/體積%L、使上述流感HA抗原之含量成為100  $\mu\text{gHA/mL}$ (相對於上述流感HA抗原1質量份，上述胺基酸為100質量份)之方式進行添加，未添加糖，除此以外，以與實施例1相同之方式獲得流感疫苗乾燥製劑。

(比較例10~14、24~28、38~42及52~56)

(添加葡萄糖之流感HA疫苗製劑)

添加作為糖之葡萄糖(和光純藥工業製造)，除此以外，以與實施例1相同之方式獲得流感疫苗乾燥製劑。

<測定例：流感HA疫苗抗原之活性測定：一元放射免疫擴散法(SRID法)>

以成為1質量%之方式將瓊脂糖(AMRESCO公司製造)加入至上述製備用PBS中，並進行加熱使之完全溶解。其後，於溫度降低至60℃左右之後適量加入與流感HA疫苗對應之抗血清進行攪拌，並流入至直徑10 cm之耐熱性之容器中，於室溫下進行冷卻而使之固形化。利用專用之衝頭開出4×4個直徑4 mm之孔，而製作SRID分析用凝膠。

利用上述製備用PBS將實施例及比較例之流感疫苗乾燥製劑溶解後，稀釋至所需濃度，進而以最終濃度成為1%之方式加入界面活性劑，使之完全溶解。將其作為試樣溶液。

使用流感疫苗原液作為標準溶液而製作30 µg/mL之流感HA抗原溶液。此時，以上述試樣溶液中所包含之添加劑(製劑中使用之調配劑及界面活性劑)之最終濃度成為相同之方式加入至疫苗原液中，並利用上述製備用PBS適當進行稀釋，使之完全溶解。亦同樣地製作22.5、15、7.5 µg/mL之流感HA抗原溶液。

以10 µL/孔使用4個等級之濃度之標準溶液及試樣溶液，使之於25℃之濕潤之條件下反應18小時～24小時左右。

利用濾紙夾住自容器取出之SRID凝膠，進而利用吸收性良好之紙夾住，並放上壓重物進行脫水。進而進行風乾使之完全乾燥。加入考馬斯亮藍(BIO-RAD公司製造)染色液進行適當時間之染色，移至脫色液進行脫色直至獲得適當之染色質像。其後，於GelBond Film(LONZA公司製造)上展開SRID凝膠，使之完全乾燥。利用Image J軟體計測所獲得之沈澱環之面積。

根據標準溶液之濃度及所獲得之沈澱環之面積值而製作校準曲線，並對試樣溶液之沈澱環之面積進行測定，根據校準曲線算出HA效價。對於所獲得之HA效價，將以添加流感HA疫苗之安慰劑溶液之效價作為100%之情形時之試驗樣品之相對值(%)記載至表1～4。

[表1]

	流感HA抗原	糖	胺基酸	活性測定(%)		
				剛製備後	2週後	1個月後
比較例1	A/加利福尼亞/7/2009 (A型H1N1)		未添加	25.4	23.0	23.9
比較例2		海藻糖	-	84.1	93.4	81.9
比較例3		蔗糖	-	90.8	85.7	86.4
比較例4		葡萄糖	-	54.9	50.4	49.1
比較例5		-	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	74.2	93.8	77.8
比較例6		-	L-離胺酸鹽酸鹽	83.2	78.9	74.4
比較例7		-	L-蘇胺酸	72.8	80.2	77.5
比較例8		-	L(-)-脯胺酸	76.3	73.0	71.8
比較例9		-	L(+)-精胺酸	55.9	56.1	51.5
實施例1		海藻糖	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	99.0	102.8	100.4
實施例2			L-離胺酸鹽酸鹽	100.3	101.9	98.7
實施例3			L-蘇胺酸	102.2	98.1	99.1
實施例4			L(-)-脯胺酸	99.5	97.0	100.7
實施例5			L(+)-精胺酸	80.8	83.9	79.9
實施例6	蔗糖	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	101.8	99.1	102.9	
實施例7		L-離胺酸鹽酸鹽	101.4	102.5	99.7	
實施例8		L-蘇胺酸	98.1	97.2	101.9	
實施例9		L(-)-脯胺酸	97.7	98.9	102.4	
實施例10	葡萄糖	L(+)-精胺酸	78.4	75.9	80.3	
比較例10		L(+)-精胺酸鹽酸鹽	83.8	81.4	79.6	
比較例11		L-離胺酸鹽酸鹽	74.8	77.2	78.2	
比較例12		L-蘇胺酸	82.1	83.1	79.4	
比較例13		L(-)-脯胺酸	82.1	81.8	80.6	
比較例14		L(+)-精胺酸	70.7	65.9	67.4	

[表2]

	流感HA抗原	糖	胺基酸	活性測定(%)		
				剛製備後	2週後	1個月後
比較例15	A/維多利亞/361/2011 (A型H3N2)	未添加		30.3	35.0	29.8
比較例16		海藻糖	-	97.5	73.2	71.0
比較例17		蔗糖	-	81.4	77.0	74.7
比較例18		葡萄糖	-	54.6	48.1	47.3
比較例19		-	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	88.1	79.3	89.6
比較例20		-	L-離胺酸鹽酸鹽	75.9	85.4	81.9
比較例21		-	L-蘇胺酸	71.8	77.3	78.2
比較例22		-	L(-)-脯胺酸	80.7	73.5	72.1
比較例23		-	L(+)-精胺酸	66.2	63.8	63.6
實施例11		海藻糖	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	99.4	97.1	103.0
實施例12			L-離胺酸鹽酸鹽	99.8	100.1	100.7
實施例13			L-蘇胺酸	102.4	97.8	99.7
實施例14			L(-)-脯胺酸	100.3	98.9	101.6
實施例15			L(+)-精胺酸	64.4	69.3	69.5
實施例16		蔗糖	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	102.4	101.2	100.9
實施例17			L-離胺酸鹽酸鹽	101.1	99.8	100.4
實施例18			L-蘇胺酸	98.6	102.5	101.2
實施例19			L(-)-脯胺酸	101.9	100.3	98.9
實施例20			L(+)-精胺酸	70.9	62.1	61.7
比較例24		葡萄糖	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	61.4	62.2	64.7
比較例25			L-離胺酸鹽酸鹽	63.9	61.5	62.4
比較例26			L-蘇胺酸	65.7	70.6	69.0
比較例27			L(-)-脯胺酸	60.3	63.9	59.8
比較例28			L(+)-精胺酸	57.3	50.6	53.6

[表3]

	流感HA抗原	糖	胺基酸	活性測定(%)		
				剛製備後	2週後	1個月後
比較例29	B/威斯康辛/1/2010 (B型山形系統)		未添加	37.7	34.0	31.1
比較例30		海藻糖	-	102.2	86.8	81.8
比較例31		蔗糖	-	101.8	99.8	97.3
比較例32		葡萄糖	-	64.6	59.5	58.3
比較例33		-	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	93.9	80.9	84.6
比較例34		-	L-離胺酸鹽酸鹽	88.7	83.1	79.5
比較例35		-	L-蘇胺酸	90.1	86.9	86.0
比較例36		-	L(-)-脯胺酸	94.5	89.1	80.4
比較例37		-	L(+)-精胺酸	71.2	65.5	63.7
實施例21		海藻糖	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	101.2	100.4	103.4
實施例22			L-離胺酸鹽酸鹽	101.8	99.3	98.7
實施例23			L-蘇胺酸	98.1	97.8	95.9
實施例24			L(-)-脯胺酸	100.1	98.3	97.6
實施例25			L(+)-精胺酸	73.8	69.9	65.5
實施例26		蔗糖	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	99.9	98.8	101.3
實施例27			L-離胺酸鹽酸鹽	100.5	98.4	97.8
實施例28			L-蘇胺酸	102.4	101.7	99.6
實施例29			L(-)-脯胺酸	96.4	95.9	95.4
實施例30			L(+)-精胺酸	61.9	59.9	57.2
比較例38		葡萄糖	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	65.8	60.3	53.1
比較例39			L-離胺酸鹽酸鹽	70.5	69.2	55.7
比較例40			L-蘇胺酸	68.0	62.2	61.9
比較例41	L(-)-脯胺酸		64.4	60.1	59.0	
比較例42	L(+)-精胺酸		60.3	58.9	52.6	

[表4]

	流感HA抗原	糖	胺基酸	活性測定(%)		
				剛製備後	2週後	1個月後
比較例43	B/布利斯班/60/2008 (B型維多利亞系統)		未添加	38.7	51.7	51.1
比較例44		海藻糖	-	102.6	83.6	91.8
比較例45		蔗糖	-	95.8	94.4	93.8
比較例46		葡萄糖	-	61.4	59.0	57.6
比較例47		-	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	95.0	96.0	94.5
比較例48		-	L-離胺酸鹽酸鹽	93.6	91.2	90.5
比較例49		-	L-蘇胺酸	89.9	86.5	85.9
比較例50		-	L(-)-脯胺酸	92.2	88.7	85.3
比較例51		-	L(+)-精胺酸	69.1	65.5	63.1
實施例31		海藻糖	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	98.9	100.6	102.0
實施例32			L-離胺酸鹽酸鹽	101.6	101.1	99.5
實施例33			L-蘇胺酸	102.8	99.4	99.1
實施例34			L(-)-脯胺酸	100.4	97.3	95.8
實施例35			L(+)-精胺酸	75.4	70.8	69.0
實施例36		蔗糖	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	101.9	100.4	98.8
實施例37			L-離胺酸鹽酸鹽	97.5	97.2	95.6
實施例38			L-蘇胺酸	100.7	97.4	96.8
實施例39			L(-)-脯胺酸	98.2	98.0	94.2
實施例40			L(+)-精胺酸	70.2	68.9	66.1
比較例52		葡萄糖	L(+)-精胺酸鹽酸鹽	72.3	68.5	68.4
比較例53	L-離胺酸鹽酸鹽		75.8	70.2	69.7	
比較例54	L-蘇胺酸		73.3	72.8	71.2	
比較例55	L(-)-脯胺酸		71.6	69.0	67.3	
比較例56	L(+)-精胺酸		68.6	64.6	58.4	

如表1~4所示，調配二糖及胺基酸之實施例能夠穩定地維持全部流感HA疫苗抗原之活性。

尤其是使用精胺酸鹽酸鹽、離胺酸鹽酸鹽、蘇胺酸或脯胺酸作為胺基酸之實施例能夠以較高之活性穩定地維持流感HA疫苗抗原之活性。尤其是根據實施例1、6、11、16、21、26、31、及36，藉由精胺酸鹽酸鹽與二糖之併用，能夠以極高之活性穩定地維持A型H1N1、A型H3N2、B型山形系統、及B型維多利亞系統之全部流感HA疫苗抗原之活性。

又，關於僅調配有糖之比較例2~4、16~18、30~32及44~46、僅調配有胺基酸之比較例5~9、19~23、33~37及47~51、未調配糖及胺基酸之比較例1、15、29及43，與實施例相比，流感HA疫苗抗原之活性未得到穩定化。

又，關於含有葡萄糖作為糖之比較例10~14、24~28、38~42及52~56，與含有海藻糖或蔗糖之實施例相比，流感HA疫苗抗原之活性未得到穩定化。

又，實施例及比較例之流感疫苗乾燥製劑之藉由乾燥減量法所測得之含水率全部為10質量%以下。

根據本發明，可提供一種即便不在嚴格地進行溫度管理之情況下進行保存亦能夠以較高之活性穩定地維持流感疫苗抗原之活性，且可穩定地供給之流感疫苗乾燥製劑。又，根據本發明，可提供該流感疫苗乾燥製劑之製造方法。

## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種流感疫苗乾燥製劑，其特徵在於：含有流感疫苗抗原、二糖及胺基酸。

### 【第2項】

如請求項1之流感疫苗乾燥製劑，其中二糖為選自由海藻糖、異麥芽糖、蔗糖、麥芽糖、蜜二糖、巴拉金糖及乳酮糖所組成之群中之至少1種以上。

### 【第3項】

如請求項1或2之流感疫苗乾燥製劑，其中胺基酸為選自由精胺酸、離胺酸、脯胺酸、蘇胺酸、鳥胺酸、丙胺酸、半胱胺酸、苯丙胺酸、甘胺酸、羥基脯胺酸、及該等之鹽所組成之群中之1種以上。

### 【第4項】

如請求項1、2或3之流感疫苗乾燥製劑，其中流感病毒抗原為不活化抗原。

### 【第5項】

如請求項4之流感疫苗乾燥製劑，其中不活化抗原為裂解疫苗抗原或次單元疫苗抗原。

### 【第6項】

如請求項4之流感疫苗乾燥製劑，其中不活化抗原為裂解疫苗抗原。

### 【第7項】

一種流感疫苗乾燥製劑之製造方法，其特徵在於：其係將含有流感疫苗抗原、二糖、及胺基酸之含流感疫苗抗原之水溶液進行乾燥者，並且

上述胺基酸為選自由精胺酸、離胺酸、脯胺酸、蘇胺酸、鳥胺酸、丙胺酸、半胱胺酸、苯丙胺酸、甘胺酸、羥基脯胺酸、及該等之鹽所組成之群中之1種以上。